动 物 学 研 究 2012，Apr. 33(2): 165−169 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.02165

气味线索对小鼠形成吗啡依赖及渴求的影响

刘小粉[1,*], 杨 光[2], 杨 锐[1], 贾 强[1], 关宿东[1]

（1. 蚌埠医学院 生理教研室，安徽 蚌埠 233030; 2. 蚌埠市第三人民医院 神经外科，安徽 蚌埠 233000）

摘要：利用条件化位置偏好模型研究气味线索对吗啡依赖及渴求的影响，其结果发现, 单一嗅觉条件刺激使小鼠建立条件化位置偏好, 形成吗啡依赖。 当改变外界环境, 动物进入完全新异的环境后依然寻求与吗啡相关的气味线索, 说明吗啡相关气味条件线索诱发了小鼠对吗啡的渴求。多巴胺 D1 或 D2 受体拮抗剂能阻断小鼠对气味线索的寻求。该结果表明嗅觉系统在药物成瘾过程中具有一定作用。

关键词：药物成瘾；吗啡依赖；多巴胺; 嗅觉线索; 条件化位置偏好模型
中图分类号：Q434；R338.2；R992; R996 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)02-0165-05

Effects of odor cue on morphine-induced dependence and craving in mice

LIU Xiao-Fen[1,*], YANG Guang[2], YANG Rui[1], JIA Qiang[1], GUAN Su-Dong[1]

(1. *Department of Physiology*, *Bengbu Medical College*, *Bengbu* 233030, *China*;
2. *Department of Neurosurgery*, *The 3rd People's Hospital of Bengbu*, *Bengbu* 233000, *China*)

Abstract: The olfactory system may play a pivotal role in drug addiction. To clarify the issues, we investigated the morphine dependence and psychological craving in morphine addicted mice using the conditioned place preference (CPP) paradigm by taking an only odor cue as the conditioned stimulus (CS). The results showed that by pairing morphine with odor, the CPP could be induced in mice. When the morphine addicted mice were exposed to a novel environment during morphine withdrawal, they spent significantly longer time in the chamber with morphine-paired odor than in the control chamber. The effects of odor cue on the morphine CPP were blocked by the administration of dopamine D1 or D2 antagonists. The studies indicated that olfactory system plays an important role in drug addiction.

Key words: Drug addiction; Morphine-induced dependence; Dopamine; Odor cue; CPP

嗅觉系统中存在如μ受体等的所有阿片类受体的分布(Kaufman et al, 1995)。fMRI（functional magnetic resonance imaging）实验表明, 急性注射海洛因后大鼠嗅皮层被广泛激活的现象能被μ受体的拮抗剂纳络酮逆转(Xu et al, 2000)。中脑边缘-多巴胺系统在奖赏系统中有着至关重要的作用。嗅觉系统也广泛分布多巴胺(DA)能神经元(Coronas et al, 1997), 从腹侧顶盖区域投射出来的多巴胺神经元广泛地投射到嗅结节。实验研究表明, 在大鼠的嗅结节局部注射可卡因可以诱导条件化位置偏好模型（conditioned place preference，CPP）的建立(Ikemoto, 2003)。在解剖结构上, 哺乳动物嗅觉系统与高级皮层, 如眶额叶和边缘系统（如杏仁核、海马等区域）之间存在广泛联系(Haberly, 2001; Savic, 2005)。大量实验表明, 海洛因或可卡因依赖者观看吸毒相关的影片、录像等引起渴求时, 额叶、边缘系统等皮层被激活(Sinha et al, 2007; Bonson et al, 2002; Volkow et al, 2010)。由此推测, 嗅觉系统可能在药物依赖过程中起重要的作用。

CPP 能反应动物对药物奖赏、依赖和心理渴求的过程, 其建立常以多种感觉刺激(触觉、视觉和嗅觉)作为条件刺激。本实验只用嗅觉这一种感觉刺激来建立小鼠对吗啡形成的依赖和渴求, 同时, 改变小鼠对吗啡形成依赖的环境, 在另一个完全新异的

收稿日期：2011-10-08；接受日期：2011-10-24
基金项目：安徽省高校优秀青年人才基金项目(2011SQRL083ZD)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: xfenr@163.com

环境中，给小鼠吗啡相关气味刺激时，检测该气味线索能否促使小鼠表现出对吗啡的渴求和DA在此过程中的作用，以及观察嗅觉系统在小鼠对吗啡形成依赖及渴求过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

ICR雄性小鼠，体重(30±3) g, 9周龄，购买于昆明医学院，在标准环境下随机分笼饲养(07:00－19:00明暗交替)，每笼8～12只，小鼠自由取食和饮水。小鼠适应实验室环境至少1周后开始实验。实验一：动物分为4组，分别为吗啡组、盐水组、吗啡气味组、盐水气味组；实验二：动物分为4组，分别为盐水组、吗啡组、DA D1拮抗剂组、DA D2拮抗剂组。

1.2 试剂

盐酸吗啡(10 mg/mL)购自沈阳制药厂；SKF83566(DA D1受体拮抗剂)和舒必力(sulpiride, DA D2受体拮抗剂)购自Sigma公司；食品添加剂薄荷和柠檬香精用于气味线索，直接使用原液。

1.3 实验装置和实验程序

1.3.1 实验一：CPP装置及实验程序 CPP实验前，随机挑选8只小鼠放入一个四面白色的长方形木箱(60 cm长×20 cm宽×30 cm高)，箱子两端分别放置含有0.5 mL柠檬和薄荷气味液体的小瓶，中间设置有孔隔板。小鼠自由活动10 min并记录其在不同气味端停留的时间。

CPP装置：四个相同的木箱，均由两个面积相同的小箱(30.7 cm长×31.5 cm宽×34.5 cm高)和相连的中间过道(13.8 cm长×31.5 cm宽×34.5 cm高)构成。其中两个小箱的视觉和触觉相同，均为黑色内壁及绿色塑胶底板，中间过道四壁灰色。

CPP实验程序分三步：第一步为适应阶段，即条件化前期(pre-conditioning phase)，即第1～3天，在此期间，小鼠每天在CPP行为箱中自由活动15 min(900 s)，全过程录像。第3天,分析小鼠在两个小箱内停留的时间。本CPP箱采用平衡设计，即动物对两个小箱无明显偏好，对任何小箱表现出强烈的非条件厌恶(少于总时间的33%)或强烈的喜好(多于总时间的67%)的动物均被舍弃。第二步为条件化建立期(conditioning phase)，即第4～7天，该阶段两个条件化小箱的门关闭。连续4天，在给小鼠腹腔注射40 mg/kg体重的吗啡后随机放入一个小箱并在该小箱内停留30 min，此箱即为阳性环境箱。间隔6 h后在另一个小箱内注射同等剂量的生理盐水且停留30 min，即为阴性环境箱。盐水组除用生理盐水代替吗啡外，其它条件与吗啡组相同。第三步为检测阶段(post-conditioning)，即第8～10天，此阶段停止给药，两个行为小箱的门打开，动物自由活动15 min，连续3天,记录每只动物在阴、阳性环境箱中停留的时间。

在CPP实验过程中，吗啡组和盐水组中CPP箱的两个小箱环境完全相同；而吗啡气味组和盐水气味组的每个CPP小箱内则随机放入有薄荷或柠檬气味的小瓶。

1.3.2 实验二：气味诱发药物寻求的实验程序 此实验在两个不同环境的房间A和B中进行。房间A内有4个相同的有机树脂小鼠饲养箱。连续4天，每天给吗啡组小鼠腹腔注射40 mg/kg体重的吗啡1次，放入有柠檬气味的小鼠饲养箱30 min，此气味为阳性气味(conditioned stimulus, CS＋odor)；间隔6 h后注射同样剂量的盐水，放入有薄荷气味的饲养箱，此气味为阴性气味(CS－odor)。盐水组小鼠除用生理盐水代替吗啡外，与吗啡组所有处理相同。DA D1拮抗剂组和D2拮抗剂组小鼠，除在每天注射吗啡30 min前腹腔注射D1受体拮抗剂(SKF83566, 1 mg/kg体重)或D2受体拮抗剂(sulpiride, 25 mg/kg体重)外，其余处理与吗啡组相同。

4天，药物(吗啡/盐水)注射后，停止给药。第5～7天，实验在房间B内进行。房间B内有如实验一的四个相同的木制CPP箱且每个箱的两个小箱完全相同。实验时，在两个小箱内随机放入阳性(柠檬气味)或阴性气味(薄荷气味)，放入阳性气味的箱称为阳性环境箱，反之，为阴性环境箱。让小鼠在两个小箱内自由活动10 min，全过程录像，分析小鼠在阴阳性箱内停留的时间。在房间A和B内，给予气味的容器的质地和形状完全不同，以保证两个环境只有气味这一共同线索。

1.4 数据分析方法

用SPSS14.0软件进行数据分析。其中实验一和实验二的组间分析用重复测量方法分析及Post-hoc (LSD)进行组间多重比较，其余的采用配对*t*-检验(paired-sample *t*-test)或单因素方差分析。

2 结 果

2.1 小鼠对柠檬和薄荷两种气味无明显偏好

如图1所示，10 min内，小鼠对柠檬和薄荷两种

气味的探求时间无明显差别(paired-sample *t*-Test: $t_{(7)}$=−1.004, *P*=0.349)，说明小鼠对两种气味无偏好。

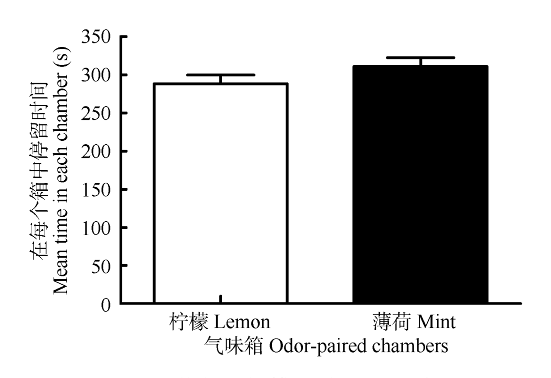


图 1　小鼠对薄荷和柠檬气味无明显偏好(*n*=8)
Fig. 1　Mice displayed an equivalent preference for mint and lemon (*n*=8)

2.2　气味线索诱导小鼠形成吗啡 CPP

组内分析采用配对样本 *t*-检验，结果表明，与适应期小鼠在阳性箱中停留的时间相比，盐水组、吗啡组、盐水气味组各组小鼠在检测期第 1～3 天均无明显差别；而吗啡气味组小鼠在检测期第 1 天($t_{(9)}$=−2.679, *P*=0.025)、第 2 天($t_{(9)}$=−3.155, *P*=0.011)和第 3 天($t_{(7)}$= −3.108, *P*=0.012)在阳性箱中停留的时间均明显多于适应期时停留的时间。

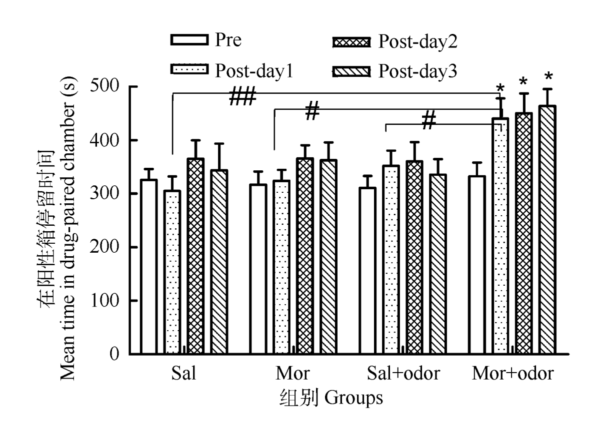


图 2 气味线索诱导小鼠建立吗啡 CPP
Fig. 2　The odor cues induced morphine CPP

：同一组小鼠戒断后各天在阳性箱停留的时间与基础值的比较 (: *P*<0.05)； #,##：同一天各组小鼠在阳性箱中停留时间的比较(#：*P*<0.05, ##: *P*<0.01)。(sal：盐水组; mor：吗啡组; sal＋odor：盐水气味组：mor＋odor：吗啡气味组)。

(*) The differences of mean time in drug-paired chambers in post-conditioning days *vs* pre-conditioning day within the same group in mice (*: *P*<0.05); (#, ##) The differences of mean time in drug-paired chambers on the same day between groups (#: *P*<0.05, ##: *P*<0.01). (sal：saline group; mor：morphine group; sal+odor：saline+odor group; mor+odor: morphine+odor group).

组间分析表明，适应期时各组小鼠在阳性箱停留的时间均无明显差异。检测期前三天的重复测量方差分析结果表明，药物处理×气味出现交互效应(interaction drug×odor)：$F_{(1, 39)}$=4.283, *P*=0.045，即受到药物和气味不同处理的影响，各组之间存在显著性差异。 Post-hoc(LSD)分析表明，在检测期第 1 天，吗啡气味组小鼠在阳性箱停留的时间明显多于在盐水组(*P*=0.004)、吗啡组(*P*=0.02)和盐水气味组(*P*=0.028)停留的时间，表明仅有气味线索，小鼠也能形成对吗啡的条件化位置偏好，对吗啡产生依赖。

2.3　小鼠在陌生环境中寻求吗啡相关的气味线索

在房间 A 中建立吗啡与气味之间的条件化后，在房间 B 内检测小鼠对阳性气味(吗啡相关气味)的寻求。组内分析表明，在检测期第 1 天($t_{(8)}$=2.783, *P*=0.024)，第 2 天($t_{(8)}$=4.301, *P*=0.003)，第 3 天($t_{(8)}$=5.0339, *P*=0.001)，吗啡组小鼠在阳性气味环境中停留的时间明显多于阴性气味环境(图 3A)，而盐水组则无明显差异(图 3B)。

重复测量方差分析表明，组间因素药物处理(drug：$F_{(1,15)}$=16.023, *P*=0.001)在两组间有显著相差异，单因素方差分析结果表明在检测期第 1 天,($F_{(1,15)}$=10.425, *P*=0.005)，吗啡组小鼠在阳性气味环境中停留的时间明显多于盐水组；在第 2 天和第 3 天，两组之间无显著性差异(图 3C)，说明动物建立吗啡依赖后，在陌生环境里依然寻求与吗啡相关的气味线索，即吗啡相关的阳性气味诱发了动物对吗啡的渴求。

2.4　DA D1 或 DA D2 受体拮抗均可阻断小鼠寻求吗啡相关的气味线索

为了检测在气味线索诱导的小鼠形成的吗啡依赖及渴求过程中，多巴胺系统是否有重要作用，每天在给予吗啡前 30 min，小鼠注射多巴胺 D1 或 D2 受体拮抗剂,并在吗啡戒断后比较小鼠在阳性、阴性气味箱停留的时间。配对 *t*-检验分析表明，在戒断第 1～3 天, DA D1 组或 DA D2 组小鼠在阳性与阴性气味环境中停留的时间无显著性差异(*P*>0.05)(图 4)，说明多巴胺在气味线索诱导小鼠形成的吗啡依赖及其渴求的过程中有重要作用。

3　讨　论

单一嗅觉条件刺激能诱导小鼠建立吗啡依赖 CPP。动物进入完全新异的环境时，依然寻求吗啡相关的气味线索，说明该气味线索诱发了小鼠对

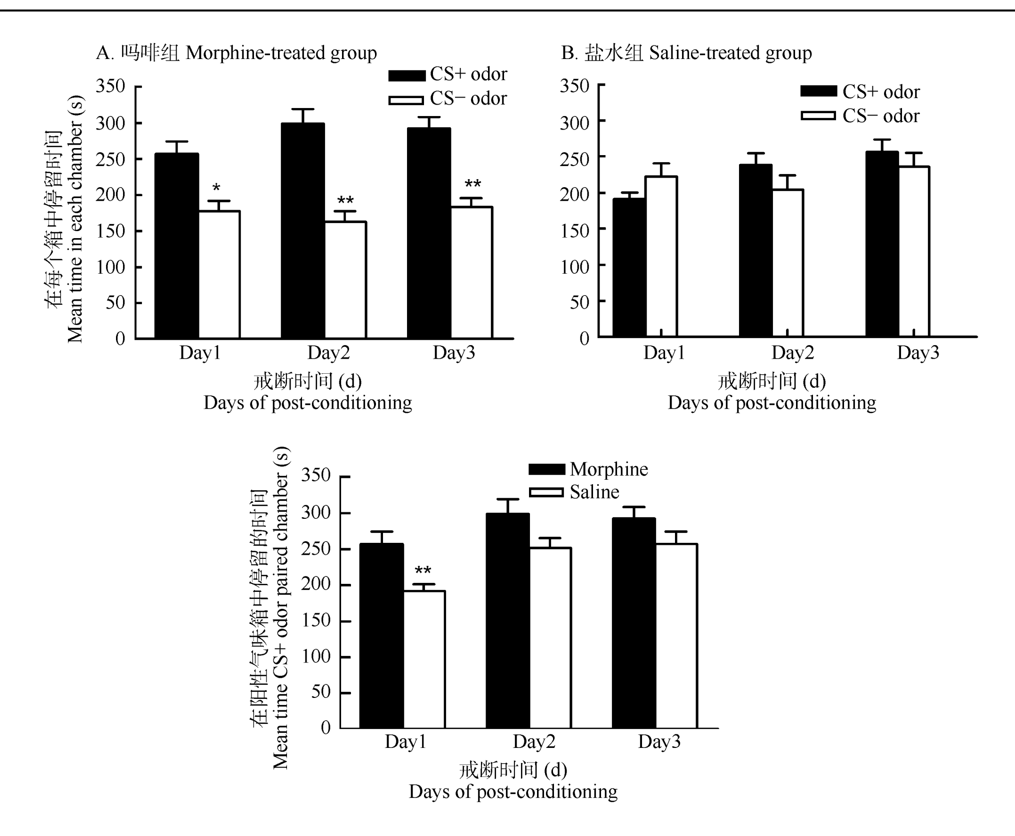


图 3 新异环境中与吗啡相关的气味线索(CS+odor)能够诱发吗啡戒断小鼠的药物寻求行为

Fig. 3 The novel environment induced morphine-addicted mice spent significant longer time in the chambers with morphine-paired odor than in the control chamber during morphine withdrawal

A, B)戒断第 1～3 天, 吗啡组(A)和盐水组小鼠(B)在阳性、阴性气味箱中停留的时间; C)吗啡组和盐水组小鼠在阳性气味箱中停留时间的比较, 吗啡组小鼠在戒断第 1 天停留的时间明显多于对照组。

A,B) The time duration of the morphine-treated mice (A) and the saline-treated mice (B) spent in the CS+odor and CS-odor chambers during the 1−3 day of withdrawal; C) The morphine-treated mice spent more time in the CS+odor chambers than the saline treated mice on the 1st day of withdrawal.

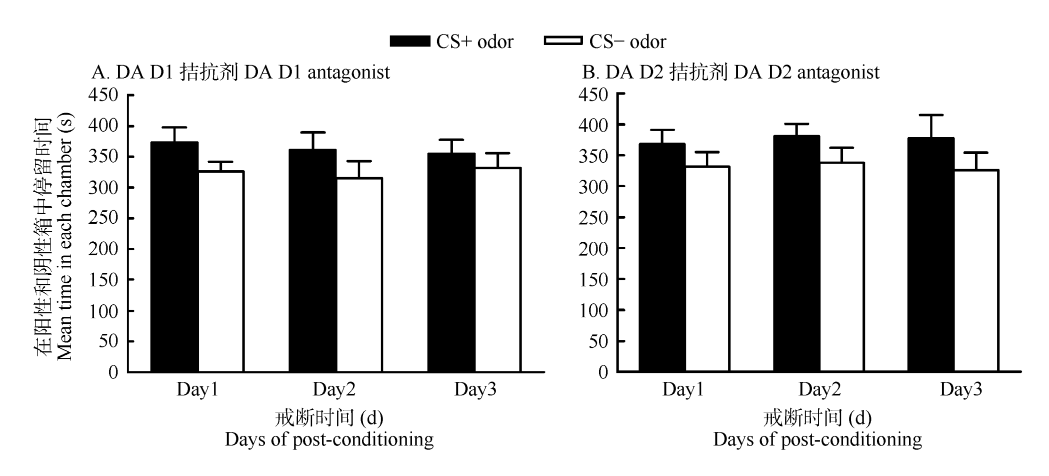


图 4 DA D1 或 DA D2 受体拮抗剂能够阻断小鼠寻求吗啡相关的气味线索

Fig. 4 Effects of odor cue on the morphine CPP were blocked by the administration of dopamine D1 or D2 antagonists

吗啡的渴求, 且多巴胺 D1 或 D2 受体拮抗剂能够阻断气味线索诱导的小鼠对吗啡的渴求。此实验表明，嗅觉系统参与了小鼠对吗啡的依赖及渴求过程。Randall et al (1992,1993)发现气味线索促使新生及成年大鼠所形成的吗啡条件化具有双效性, 即低剂量吗啡形成条件化位置偏好, 高剂量吗啡则形成条件化位置厌恶。在本实验条件下, 气味线索能使小鼠对吗啡形成明显的条件偏好。

在人类，药物成瘾伴随着强迫性药物寻求及复吸等行为。其中与药物相关环境线索是诱发复吸的强迫性动机之一。实验表明，药物相关线索刺激会诱发海洛因或可卡因依赖者的复吸行为(Childress et al, 1999; Shalev et al, 2002; Koob & Le Moal, 2008)。动物实验研究表明，吗啡戒断相关的气味线索使大鼠产生僵直等防御反应(McNally & Akil, 2001)，吗啡条件化气味刺激能引起镇痛应答，降低疼痛感(Valone et al, 1998)。本实验中，在小鼠建立气味与吗啡之间的条件化后，改变小鼠对吗啡形成依赖的外界环境，在完全新异的环境中给予先前的吗啡相关环境线索刺激，结果表明，吗啡戒断后数天内小鼠在阳性气味环境中停留的时间明显多于阴性气味环境，说明小鼠不仅能建立气味和吗啡之间的条件化关系，而且能提取该联合型记忆，表现出对吗啡的渴求。因此，嗅觉系统在药物依赖、渴求等行为中有重要作用。

DA 在药物成瘾中有极其重要的作用，阿片类(吗啡和海洛因)通过作用于γ-氨基丁酸(GABA)中间神经元上的μ受体抑制 GABA 神经元的活动，降低 GABA 对腹侧被盖区的多巴胺(DA)神经元的抑制，兴奋DA神经元，使DA 释放量增加(Johnson & North, 1992)。多巴胺 D1 或 D2 受体拮抗剂能阻断在大鼠的嗅结节局部注射可卡因诱导的 CPP (Ikemoto, 2003)，损毁嗅结节内的多巴胺能神经投射也阻断了 CPP 的建立(Sellings et al，2006)。我们的实验也表明，多巴胺D1 或D2 受体拮抗剂能够阻断动物对吗啡相关气味的寻求，即多巴胺参与了气味线索诱导小鼠形成的吗啡依赖及其渴求的过程。

人类药物滥用者即使戒断很长时间后，依然呈现出高复吸率，其中药物相关的环境线索是诱发其复吸的原因之一。本实验研究表明，即使完全改变动物对吗啡产生依赖的大环境，仅保留唯一与药物相关的气味线索也能够诱发小鼠对吗啡的寻求。因此，至少对于啮齿类动物而言，嗅觉刺激可能是研究药物相关线索诱发成瘾的较好手段,以期了解线索条件诱发人类药物依赖和渴求的机制。最后，相对于用多种感觉刺激(触觉、嗅觉或视觉)建立吗啡 CPP，将气味作为唯一感觉刺激，简单、直接、有效。

参考文献：

Bonson KR, Grant SJ, Contoreggi CS, Links JM, Metcalfe J, Weyl HL, Kurian V, Ernst M, London ED. 2002. Neural systems and cue-induced cocaine craving [J]. *Neuropsychopharmacology*, **26**(3): 376-386.

Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, O'Brien CP. 1999. Limbic activation during cue-induced cocaine craving [J]. *Am J Psychiatry*, **156**(1): 11-18..

Coronas V, Srivastava LK, Liang JJ, Jourdan F, Moyse E. 1997. Identification and localization of dopamine receptor subtypes in rat olfactory mucosa and bulb: a combined in situ hybridization and ligand binding radioautographic approach [J]. *J Chem Neuroanat*, **12**(4):243-257.

Haberly LB. 2001. Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry [J]. *Chem Senses*, **26**(5): 551-576.

Ikemoto S. 2003.Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: intracranial self-administration studies [J]. *J Neurosci*, **23**(28): 9305-9311.

Johnson SW, North RA. 1992. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local inteneurons [J]. *J Neurosci*, **12**(2): 483-488

Kaufman DL, Keith DE Jr, Anton B, Tian J, Magendzo K, Newman D, Tran TH, Lee DS, Wen C, Xia YR, Lusis AJ, Evans CJ. 1995. Characterization of the murine mu opioid receptor gene [J]. *J Biol Chem*, **270**(26): 15877-15883.

Koob GF, Le Moal M. 2008. Addiction and the brain antireward system [J]. *Annu Rev Psychol*, **59**: 29-53.

McNally GP, Akil H. 2001. Effects of contextual or olfactory cues previously paired with morphine withdrawal on behavior and pain sensitivity in the rat [J]. *Psychopharmacology*, **156**(4): 381-387.

Randall CK, Kraemer PJ, Dose JM, Carbary TJ, Bardo MT. 1992. The biphasic effect of morphine on odor conditioning in neonatal rats [J]. *Dev Psychobiol*, **25**(5): 355-364.

Randall CK, Kraemer PJ, Valone JM, Bardo MT. 1993. Odor conditioning with morphine: conditioned preference, aversion, and analgesia [J]. *Psychobiology*, **21**(3): 215-220.

Savic I. 2005 Brain imaging studies of the functional organization of human olfaction [J]. *Chem Senses* , **30**(suppl 1): i222-i223

Sellings LH, McQuade LE, Clarke PB. 2006. Evidence for multiple sites within rat ventral striatum mediating cocaine conditioned place preference and locomotor activation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, **317**(3): 1178-1187.

Shalev U, Grimm JW, Shaham Y. 2002.Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review [J]. *Pharmacol Rev*, **54**(1): 1-42.

Sinha R, Kimmerling A, Doebrick C, Kosten TR. 2007. Effects of lofexidine on stress-induced and cue-induced opioid craving and opioid abstinence rates: preliminary findings [J]. *Psychopharmacology*, **190**(4): 569-574.

Valone JM, Randall CK, Kraemer PJ, Bardo MT. 1998. Olfactory cues and morphine-induced conditioned analgesia in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, **60**(1): 115-118.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Telang F, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C, Swanson JM. 2010. Cognitive control of drug craving inhibits brain reward regions in cocaine abusers [J]. *Neuroimage*, **49**(3): 2536-2543.

Xu H, Li SJ, Bodurka J, Zhao X, Xi ZX, Stein EA. 2000. Heroin-induced neuronal activation in rat brain assessed by functional MRI [J]. *Neuroreport,* **11**(5): 1085-1092.